



REPÚBLICA DE CUBA

OFICINA CUBANA
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL

JC997 U.S. PTO
09/864486
05/24/01

**Lic. América N. Santos Riveras, Directora General de la
OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.**

CERTIFICO: Que bajo el número ciento veintidós del año dos mil del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por **FRAGMENTOS DE ADN DEL GEN ICL DE LA LEVADURA METILOTROFICA DE PICHIA PASTORIS**, con fecha veintiséis de mayo de dos mil, a las diez horas ante meridiano, por Argia Poveda Marcheco, Representante, ciudadana cubana, a nombre y en representación del **CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA** cuya invención fue creada por Javier Menéndez Díaz, Iris Valdés Prado y Nelson Cabrera León.

ASIMISMO CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

TAMBIEN CERTIFICO: Que la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones y los Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a los que obran en el expediente.

Y a petición de Mariela Vázquez Castillo, Agente Oficial, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los catorce días del mes de mayo de dos mil uno.


**Lic. América N. Santos Riveras
Directora General**

MEMORIA DESCRIPTIVA

FRAGMENTOS DE ADN DEL GEN ICL DE LA LEVADURA METILOTROFICA *Pichia pastoris*.

El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante ha permitido el empleo de diferentes microorganismos como hospederos para la expresión de proteínas de interés, tanto farmacéutico como industrial. Dentro de los microorganismos eucariotas de mayor uso en la biotecnología actual, se encuentra la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, en la última década, levaduras de los géneros *Pichia*, *Hansenula*, *Candida* y *Kluyveromyces*, se han empleado eficientemente como sistemas de expresión (P.E. Sudbery, 1994, Yeast 10:1707-1726).

En este sentido, ha sido de particular interés, el contar para estos microorganismos, con regiones 5' reguladoras (referidas aquí como promotores) que permitan alcanzar altos niveles de transcripción del ADN y que respondan además a señales provenientes del medio de crecimiento. El contar con este tipo de regiones promotoras, garantiza que durante la producción de una proteína recombinante de interés, se pueda separar la fase de crecimiento de la fase de producción de la proteína, evitando así la selección de cepas no productoras.

En los últimos años se han desarrollado varios sistemas de expresión empleando la levadura *P. pastoris* y una variedad de vectores que permiten la selección de los transformantes en la cepa hospedera (Cregg et al., 1993, Bio/Technology 11: 905-910). En todos los casos estos sistemas tienen en común el empleo del promotor del gen alcohol oxidasa (*AOX1*). Entre las ventajas que se pueden señalar del empleo de este promotor tenemos el uso de una fuente de carbono barata, como es el caso del metanol, que se obtiene como subproducto de la industria del petróleo. Además este sistema de expresión en *Pichia* es altamente regulable favoreciendo su uso en la expresión de productos que pueden ser tóxicos al hospedero que lo produce.

A pesar del gran número de proteínas que se han expresado en *P. pastoris* empleando el promotor *AOX1* (Cereghino y Cregg, 2000, FEMS Microbiology Reviews 24: 45-66), es de particular interés el contar con otras regiones promotoras que respondan a la presencia o ausencia de otras fuentes de carbono diferentes del metanol. Lo anterior reviste particular importancia en las fermentaciones a gran escala donde se manejan grandes volúmenes de metanol.

Como se mencionó anteriormente, dentro del campo en que se desarrolla la presente invención, un objetivo importante se centra en el desarrollo de un sistema de expresión en el que la transcripción del gen de interés se regule por la fuente de carbono presente en el medio de cultivo. La expresión del gen estructural *ICL* es reprimida si la fuente de carbono presente en el medio es la glucosa, y la expresión se induce en ausencia de glucosa o en presencia de etanol. Debido a esta característica, resulta atractivo desde el punto de vista biotecnológico el empleo de la región promotora de este gen para dirigir la expresión de proteínas. En este sentido en la levadura *S. cerevisiae* se ha desarrollado un novedoso sistema de expresión empleando la región promotora del gen estructural *ICL* de *Candida tropicalis* (T. Kanai et al., 1996, Appl. Microbiol Biotechnol 44:759-765).

De acuerdo con la presente invención, se ha aislado un fragmento de ADN que se corresponde con la región reguladora 5' del gen *ICL* de la levadura *P. pastoris*. Otro aspecto de la presente invención es el aislamiento de un fragmento de ADN que comprende la secuencia terminadora de la transcripción del gen *ICL* de *P. pastoris*.

Un último aspecto de la presente invención es la construcción de un vector el cual contiene un fragmento de ADN derivado del gen *ICL* de la levadura *P. pastoris*, fusionado al gen estructural codificante para la enzima dextranasa (*dexA*) del hongo *Penicillium minioluteum*. Este fragmento de ADN, correspondiente a la región promotora del gen *ICL* regula la expresión del gen *dexA*, en la cepa hospedera.

Las regiones reguladoras 5' y 3' del gen *ICL* se aislaron de la levadura *P. pastoris* BKM90 (BKM, Moscú) mediante un método descrito en los ejemplos de realización. La metodología general seguida para el aislamiento del gen consistió en el aislamiento de una sonda de ADN correspondiente a la región codificante del gen. Esta sonda se obtuvo mediante la reacción en cadena de la polimerasa empleando oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de secuencias de amino ácidos descritas en la literatura para la enzima *ICL* de diferentes especies (identificados en la lista de secuencias como Seq. 3 y Seq. 4, donde W es A o T, R es A o G, Y es C o T, H es A, C o T y N es A, C, G o T).

El fragmento de 1.2 kb obtenido, se hibridó en un experimento de "Southern blot" con el ADN cromosomal de la levadura *P. pastoris* el cual se digirió previamente con diferentes enzimas de restricción. La hibridación se realizó según Sambrock et al. (1989). Teniendo en cuenta el resultado de la hibridación se construyó una biblioteca de ADN de *P. pastoris* según Sambrock et al. (1989).

La secuencia nucleotídica del fragmento aislado de la biblioteca de ADN que contiene el gen así como las regiones reguladoras se determinó mediante el método de los dideoxinucleótidos (F. Sanger et al., 1977, P.N.A.S. 74:5463-5467). La secuencia reguladora 5' del gen *ICL* está contenida dentro de un fragmento comprendido entre el sitio *EcoR* I en la posición -684 y el sitio *Ava* II cercano al inicio del gen estructural en la posición +7.

Específicamente la secuencia reguladora 5' del gen *ICL*, que comprende un region de 684 pb, se subclonó en el vector pGEM®-T (Promega, USA) denominándose TvpICL (Figura 8). El mismo se introdujo en la cepa de *E. coli* TOP10F' [F' {tet^r} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80 Δ *lac*- Δ M15 Δ *lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (*ara,leu*)7697 *galU galK* λ^- *rpsL endA1 nupG*] (Invitrogen, San Diego, California), la cual se nombró TPIC-1.*

Con el objetivo de utilizar esta región reguladora del gen *ICL*, el fragmento de 684 pb se fusionó a una secuencia de ADN heteróloga que codifica para al menos un polipéptido. En este caso la secuencia de ADN heteróloga consiste en diferentes secuencias que no se encuentran en la naturaleza unidas a la región reguladora empleada. La secuencia de ADN heteróloga empleada en la presente invención se corresponde, aunque no esta limitada, al gen estructural codificante para la enzima dextranasa del hongo *P. minioluteum*. La secuencia de ADN heteróloga empleada en la presente invención contiene el codón de iniciación ATG y el codón de parada.

Para valorar la funcionalidad de la región reguladora del gen *ICL* en la expresión de la enzima dextranasa, es necesario introducir la fusión obtenida entre la región reguladora y el gen estructural en un vector que permita la transformación de la levadura. En la literatura se han descrito numerosos vectores útiles para la transformación los cuales contienen todos los elementos necesarios para garantizar su propagación tanto en bacterias como en levaduras.

Entre las células hospederas en las que se puede emplear la región promotora del gen *ICL* de *P. pastoris*, se encuentran las levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Candida* y *Pichia* pero es de particular interés su empleo en *P. pastoris*. La introducción de la región promotora en una de las cepas hospederas empleando un vector apropiado, se realiza mediante alguno de los métodos de transformación descritos en la literatura.

Una vez introducida la fusión del promotor *ICL* y el gen estructural codificante para la enzima dextranasa, en la cepa hospedera, la expresión del gen heterólogo se produce en

respuesta a la fuente de carbono presente en el medio de cultivo. Durante la fase de crecimiento en glucosa la transcripción del gen se produce una vez agotada esta fuente de carbono, o cuando se añade etanol al 3% al medio de cultivo.

La región 3' terminadora de la transcripción del gen *ICL* tiene como función garantizar la disociación del complejo de transcripción o estabilizar el ARNm cuando se une en la posición 3' a una secuencia de ADN que codifica para un polipéptido. La región terminadora de la transcripción se caracterizó mediante la determinación de su secuencia nucleotídica y se corresponde con el fragmento comprendido de la posición 2337 a la 2697. La región terminadora de la transcripción del gen *ICL* puede fusionarse a secuencias de ADN heterólogas que codifiquen para un polipéptido y emplearse para terminar la transcripción o estabilizar el ARNm en levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Candida* y *Pichia* pero es de particular interés su empleo en *P. pastoris*.

Los ejemplos prácticos que ilustran la presente invención se describen a continuación.

Depósito del microorganismo.

El plásmido TPIC-1 fue depositado según el Tratado de Budapest en el BELGIAN COORDINATED COLLECTION OF MICROORGANISMS - BCCMTM LMBP-COLLECTION, Gent, Bélgica con número de acceso LMBP 4107 el 15 de Mayo del 2000.

EJEMPLOS DE REALIZACION

EJEMPLO 1. Regulación del gen *ICL* en la levadura *Pichia pastoris*.

En este ejemplo se empleó la cepa de *P. pastoris* BKM 90. La presencia de la enzima en los diferentes cultivos, se determinó midiendo la actividad enzimática isocitrato liasa (ICL) en condiciones de represión (fase exponencial de crecimiento) y en condiciones de desrepresión (fase estacionaria de crecimiento). Para esto las células se crecieron en 50 ml de medio YP, el cual contiene 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona en 1 litro de agua, o en medio YP al que se le adiciona 20 g de glucosa (medio YPD) o 25 ml de etanol absoluto (medio YPE). Una vez alcanzada una D.O._{600nm} de 1, se colectó el equivalente a 100 mg de células (peso húmedo), las que se lavaron dos veces con 20 ml de agua destilada estéril y se guardaron a -20°C para su posterior procesamiento (cultivos en fase exponencial). El resto de los cultivos se incubaron hasta una D.O._{600 nm} superior a 10, después de lo cual se colectó el equivalente a 100 mg de célula (peso húmedo) y se procedió de la misma manera a la descrita anteriormente (cultivo en fase estacionaria).

Una vez colectadas las muestras, se realizó la obtención de los extractos enzimáticos empleados para la determinación de la actividad ICL. Para esto las muestras se descongelaron en hielo, se lavaron con 1 ml de agua estéril y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. Posteriormente las células se resuspendieron en 500 μ l de tampón de ruptura (50 mM Tris-HCl pH=7.4, 1 mM DTT) y se le adicionó 1 g de perlas de vidrio. La ruptura de las células se realizó agitando tres veces durante 1 min en vortex con reposo intermedio de 1 min en hielo. Las perlas de vidrio se separaron centrifugando a 1000 rpm, seguidamente el sobrenadante se pasó a otro tubo, el cual se empleó en las determinaciones enzimáticas y de proteína. Las proteínas totales presentes en los extractos enzimáticos se determinaron por el método de Lowry (Lowry et al., 1951, J.Biol.Chem. 193:265-269).

La actividad ICL se determinó en los extractos celulares de acuerdo a la reacción que cataliza esta enzima, al utilizar el isocitrato como sustrato y formar como producto de la reacción succinato y glioxilato. El glioxilato puede a su vez, al reaccionar su grupo carbonilo con el clorhidrato de fenilhidrazina, originar un compuesto coloreado cuya absorbancia se determina a 324 nm (el coeficiente de extinción molar del mismo es $1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Dixon y Kornberg, 1959, Biochem J.72:3P). Para realizar los ensayos enzimáticos se mezclaron los extractos celulares obtenidos de diferentes cultivos con una mezcla de reacción formada por: 0,4 M isocitrato, tampón de reacción (1M KH_2PO_4 pH=7; 1 M MgCl_2 y 2 M KCl .) incubado previamente a 37°C, 20 mM glutatión reducido y 60 mM clorhidrato de fenilhidrazina en un volumen total de 500 μ L. Como blanco se empleó la misma mezcla de reacción sin el sustrato. La actividad específica por mg de proteína se calculó y se indicó como mU/mg de proteína. Una unidad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un μ mol de ácido glioxílico en un minuto a pH 7 y 37°C. Los resultados de la actividad enzimática se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Valores de actividad Isocitrato liasa medida en extractos celulares preparados a partir de cultivos de *Pichia pastoris* crecidos en medio rico YP suplementado con glucosa o etanol como única fuente de carbono. E: fase de crecimiento exponencial, S: fase de crecimiento estacionaria.

Medio de cultivo	Act. ICL (μ /mg)*	
	E	S
YPD	<1	48
YPE	89	66
YP	39	21

*La actividad enzimática se expresó en nmoles/minuto/mg de proteínas y el valor representa la media de tres experimentos independientes. La desviación estándar fue menos del 5% del valor de la media calculada.

En los cultivos crecidos en glucosa como única fuente de carbono, no se detectó actividad ICL en fase exponencial de crecimiento. En estas condiciones no se requiere la expresión de la enzima a diferencia de la fase estacionaria, donde se necesita para poder consumir el etanol producido en el metabolismo secundario. En el caso de los cultivos crecidos en medio YP o en medio YP suplementado con etanol, en ambas condiciones se detecta actividad enzimática.

En *S. cerevisiae* se han reportado evidencias similares para la expresión del gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa, bajo el control del promotor *ICL1*. El cual muestra en la cepa silvestre 300 veces más actividad β -galactosidasa en condiciones de desrepresión, en comparación con la actividad mostrada en condiciones de represión (Schöler y Schüller, 1993, Curr. Genet.23:375-381).

Con el objetivo de conocer si la expresión de la enzima se regula a nivel transcripcional, se extrajeron los ARNm (Sambrook *et al.*, 1989) de los cultivos crecidos en las condiciones descritas anteriormente. Como se puede apreciar en la figura 1, la expresión de la enzima se regula a nivel transcripcional, ya que en las muestras extraídas en fase de crecimiento exponencial, donde la concentración de glucosa en el medio es alta, no muestran la señal de hibridación específica correspondiente al ARNm de la isocitrato liasa, sin embargo una vez agotada la glucosa si se observa esta señal. Por su parte los ARN extraídos de los cultivos crecidos en YP o en YPE también muestran un ARNm específico de esta enzima. Como se demuestra en la figura 2, la glucosa no solo causa la represión de la expresión del gen sino que induce la degradación del ARNm presente en los cultivos crecidos en YPE. Estos resultados en su conjunto nos indican que la enzima es reprimida por la glucosa y se expresa en ausencia de la misma o en presencia de etanol.

EJEMPLO 2. Aislamiento del gen *ICL* de la levadura *Pichia pastoris*.

En la literatura se ha reportado el clonaje y caracterización de los genes codificantes para la enzima isocitrato liasa de diferentes microorganismos. El análisis y comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de ADN determinada para la isocitrato liasa de *S. cerevisiae*, *Y. Lipolytica*, y *C. tropicalis*, extraídas de la base de datos EMBL, permitió el diseño de oligonucleótidos degenerados que se corresponden con regiones conservadas en el extremo N-terminal (Seq. 3) y el C-terminal (Seq. 4) de la proteína.

Con estos oligonucleótidos y utilizando como molde ADN genómico extraído de la levadura *P. pastoris*, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la extensión del fragmento de interés. La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa se realizó esencialmente según el procedimiento descrito en la literatura (Saiki et al., 1988, Science 239: 487-491).

Como resultado se obtuvieron tres bandas mayoritarias de 0.5, 0.7 y de 1.2 kb. De las cuales, la banda de 1.2 kb debe corresponderse con la mayor parte de la región codificante del gen *ICL* de la levadura *P. pastoris*, teniendo en cuenta el tamaño esperado de acuerdo a la secuencia del gen *ICL* de *S. cerevisiae* descrita en la literatura (Fernández et al., 1992, Eur. J. Biochem. 204:983-990).

La banda de 1.2 kb se subclonó en el vector-T (pMOSBlue, Amersham) y el plásmido resultante se denominó TvICL. La secuenciación del fragmento clonado empleando oligonucleótidos universales de la serie M13mp/pUC corroboró que el mismo presenta una identidad del 70 % con el gen codificante para la isocitrato liasa de *S. cerevisiae*.

El plásmido TvICL se digirió con las enzimas *Nco* I y *Eco*R I y el fragmento de 1.2 kb resultante se aisló de un gel de agarosa de bajo punto de fusión (SIGMA) al 0.8 % y se marcó con α -ATP³² empleando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa (Sambrook et al., 1989).

El ADN extraído de la levadura *P. pastoris* se digirió (10 μ g) con las enzimas de restricción *Bam*H I, *Bgl* II, *Eco*R I y *Hind* III y se hibridó en un experimento de "Southern blot" empleando como sonda el fragmento de 1.2 kb mencionado anteriormente. En todos los casos se observó una única banda de 9, 6, 4 y 1.9 kb respectivamente. Por lo que esta sonda se empleó para pesquisar una librería genómica construida de acuerdo a como se describe a continuación.

Primeramente se digirieron 10 µg de ADN de *P. pastoris* con la enzima de restricción *EcoR* I y el producto de la digestión se separó en un gel de electroforesis de bajo punto de fusion (SIGMA) al 0.8 %. Los fragmentos comprendidos entre 3.5 y 5 kb se purificaron mediante tratamiento con fenol-cloroformo y se ligaron al vector pBluescript (Amersham) digerido previamente con la enzima *EcoR* I y tratado con fosfatasa alcalina (CIP). La genoteca se propagó mediante transformación empleando células competentes MC1061 (Sambrook *et al.*, 1989), las que se sembraron en medio LB suplementado con 50 µg/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se hibridaron con la sonda de 1.2 kb y los plásmidos extraídos de las colonias que dieron señales positivas se denominaron pIVICLPp1-5. El mapa de restricción de este plásmido se muestra en la figura 3.

EJEMPLO 3. Secuenciación del gen *ICL* de *Pichia pastoris*

La secuencia nucleotídica del gen *ICL* se determinó empleando el método de los dideoxinucleótidos (F. Sanger et al., 1977, P.N.A.S. 74:5463-5467). Se secuenció un fragmento de 2732 pb del clon pIVICLPp para lo cual se emplearon, tanto oligonucleótidos universales de la serie M13mp/pUC así como oligonucleótidos específicos derivados de la secuencia obtenida. Este fragmento contiene un marco abierto de lectura de 1653 pb (551 codones). Este gen codifica para una proteína con una masa molecular teórica de 60610 Da. La región 5' no traducida (Seq.1) muestra una posible caja TATA (consenso TATAA) en la región -96 con respecto al ATG.

La comparación de la secuencia de amino ácidos deducida a partir de la secuencia de ADN determinada anteriormente mostró que existe un 70% de identidad con el gen aislado de la levadura *C. tropicalis*, un 63 % con el de las levaduras *Y. Lipolytica* y *S. cerevisiae* y un 58 % con la del hongo *Neurospora crassa*.

EJEMPLO 4. Análisis funcional del fragmento de ADN aislado

La confirmación de que el gen *ICL* de la levadura *P. pastoris* está contenido en el fragmento clonado, se llevó a cabo de acuerdo a como se describe en los siguientes ejemplos de realización.

(1) Expresión del gen *ICL* en una cepa de *S. cerevisiae* *ict*

Para la expresión del gen *ICL* de *P. pastoris* en una cepa de *S. cerevisiae*, los vectores pRS316 (Sikorski y Hieter, 1989, Genetics 122:19-27) y pRS426 (Christianson et al., 1992, Gene 110:119-122) se digirieron con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Sma* I y se ligaron al fragmento de 2.5 kb *EcoR* I-*Dra* I extraído del plásmido pIVICLPp para dar

lugar a los plásmidos pRS316-ICL y pRS426-ICL. Un esquema detallado de la construcción de este plásmido se muestra en la figura 4.

Estos plásmidos se transformaron en una cepa de *S. cerevisiae* deficiente en el gen codificante para la enzima isocitrato liasa (cepa FMY401). La cepa transformada con cada uno de estos plásmidos fue capaz de crecer en placas de medio mínimo con etanol como única fuente de carbono, lo que evidencia que el gen codificante para esta enzima es funcional en un hospedero heterólogo.

(2) Interrupción del gen *ICL* y obtención de una cepa *icl*⁻

La interrupción del fragmento aislado en la presente invención se realizó empleando el gen *HIS3* de *S. cerevisiae*, el cual se expresa eficientemente en *P. pastoris* bajo su propia región promotora (Yong et al., 1991, Biotecnol Aplic. 9:55-61). El uso del gen *HIS3* de *S. cerevisiae* para realizar la interrupción tiene como ventaja que disminuye la obtención de falsos positivos en *P. pastoris* durante el proceso de transformación. Esto se debe a que se reduce la frecuencia de ocurrencia de conversión génica entre el gen *HIS3* presente en el plásmido y el alelo mutante *his3*⁻ presente en el cromosoma (García et al., 2000, Biotecnol Aplic. 17:11-15).

Para realizar la interrupción, el fragmento de ADN clonado en el plásmido pIVICLPp, este plásmido se digirió con la enzima *EcoR* I y se romaron los extremos 5' protuberantes mediante tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa en presencia de 33 mM de cada uno de los deoxinucleótidos. Posteriormente se digirió con la enzima *Dra* I y el fragmento de 2.8 kb resultante se clonó en el vector pOV10 (Vincent y Gancedo, 1995, Curr. Genet 27:387-389), que fue previamente digerido con la enzima *Sma* I, para dar lugar al plásmido denominado pOVICL.

Por último, el fragmento de 2 kb que contiene el gen *HIS3* de *S. cerevisiae* se obtuvo del plásmido pUC-HIS3Sc digerido con las enzimas *Sma* I y *Xba* I y se clonó en el vector pOVICL que fue digerido previamente con las enzimas *Sma* I y *Xba* I dando como resultado el plásmido pOVICL::HIS3. Ver esquema detallado de la construcción de este plásmido en la figura 5.

En este plásmido el gen *HIS3* queda flanqueado en ambos lados por 400 pb del gen *ICL* lo cual se emplea para dirigir la integración sitio específica. Este plásmido se digirió con las enzimas *Xho* I y *Not* I previo a la transformación. El hecho que la cepa transformada no pueda crecer en medio mínimo con etanol como fuente de carbono, unido al experimento descrito en el acápite anterior, demuestra que en *P. pastoris* existe un solo gen codificante

para la enzima isocitrato liasa y que el fragmento aislado y secuenciado en la presente invención se corresponde con el gen estructural de la levadura *P. pastoris*.

EJEMPLO 5. Construcción del plásmido pIV-1 y pIVDEX

Para la construcción del vector pUCTTAOX el cual contiene el terminador de la transcripción del gen *AOX1* de *P. pastoris*, el mismo se aisló mediante la reacción en cadena de la polimerasa empleando el ADN de la levadura como molde en la reacción y los oligonucleótidos NC-1 (identificado en la lista de secuencia como Seq. 5) y NC-2 (identificado en la lista de secuencia como Seq. 6).

El producto de 300 pb obtenido se purificó de un gel de agarosa al 0.8 % y se clonó en el plásmido pUC19 previamente digerido con las enzimas de restricción *Pst* I y *Hind* III. Posteriormente el plásmido pUCTTAOX obtenido, se digirió con la enzima *Hind* III y se romó el extremo empleando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa en presencia de 33 mM de cada uno de los dioxinucleótidos. Seguidamente se digirió con la enzima *Xba* I y el producto de la reacción se ligó con un fragmento de ADN de 2 kb que contiene el gen *HIS3* de *P. pastoris*. Este fragmento se obtuvo digiriendo el plásmido pBS-HIS3Pp con las enzimas *EcoR* V y *Xba* I. El plásmido resultante se denominó pIV-1 (Figura 6).

Por su parte para la construcción del vector de expresión pIVDEX, el fragmento de 684 pb que contiene la región de regulación 5' del gen *ICL* (identificado en la lista de secuencia como Seq. 1) se aisló mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Para lo cual se sintetizaron químicamente los oligonucleótidos IC-15 (identificado en la lista de secuencia como Seq. 7) y IC-17 (identificado en la lista de secuencia como Seq. 8).

Seguido de la amplificación, el fragmento de interés se clonó en el vector pGem-T (Promega, USA) dando lugar al plásmido TvpICL, el cual se digirió posteriormente con las enzimas de restricción *Xho* I y *Nhe* I y el fragmento de 684 pb se clonó en el vector TVDEX digerido previamente con las enzimas *Sal* I y *Nhe* I. El plásmido resultante se denominó pIV-2.

Para la construcción del plásmido TVDEX descrito en el párrafo anterior, el gen codificante para la enzima dextranasa del hongo *Penicillium minioluteum*, se aisló mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando los oligonucleótidos IC-18 (identificado en la lista de secuencia como Seq. 9) y IC-19 (identificado en la lista de secuencia como Seq. 10). El producto de la reacción se clonó en el vector pGem-T (Promega, USA) dando lugar al plásmido TVDEX.

El plásmido pIV-2 se digirió con las enzimas *EcoR* I y *Nru* I y el producto de la digestión, que contiene el promotor del gen *ICL* fusionado al gen codificante para la enzima dextranasa y en el que se emplea la señal de secreción del gen *SUC2* de *S. cerevisiae*, se clonó en el vector pIV-1, digerido previamente con la enzima *Sal* I, romado este extremo por la acción del fragmento Klenow de la ADN polimersa y digerido finalmente con la enzima *EcoR* I. La construcción del plásmido pIVDEX se muestra en la figura 7.

EJEMPLO 6.

Expresión del gen estructural codificante para la enzima dextranasa empleando el promotor del gen *ICL*.

La levadura *P. pastoris* MP36 (*his3⁻*) (Yong, 1992, *Biotechnol Apl* 9:55-61) se transformó con el plásmido pIVDEX mediante el método de electroporación, esencialmente según lo descrito por Becker y Guarente (1991, *Methods Enzymol* 194:182-187). Previo a la transformación el plásmido se digirió con la enzima *Sma* I para facilitar la integración en el genoma. Las células se electroporaron en cubetas de 0.2 cm a 1500 V, 25 μ F, 400 Ω (BioRad Gene Pulser), inmediatamente después del pulso se añadió 1 mL de Sorbitol 1 M frío y los transformantes *His⁺* se obtuvieron en placas YNB con glucosa al 2%. Las placas se incubaron a 28°C hasta la aparición de los transformantes.

La funcionalidad del fragmento 5' empleado se determinó midiendo la actividad dextranasa en cultivos de 50 ml de medio YNB suplementado con 2 % de glucosa o con 3 % de etanol como únicas fuentes de carbono. La actividad se midió durante la fase de crecimiento exponencial (DO_{530nm} de 1) y en fase de crecimiento estacionaria (DO_{530nm} de 6). En cada caso se empleó el sobrenadante de cultivo para la determinación de la actividad enzimática.

Ensayo de actividad dextranasa:

La actividad dextranasa se determinó según Kosaric et al. (Kosaric et al., 1973, *Biotech Bioeng* 15:729-741), mediante la cuantificación de los azúcares reductores liberados producto de la acción de la enzima. Los azúcares reductores se determinaron por la reacción con el ácido dinitro salicílico (DNSA) (Miller, 1959, *Anal. Chem.* 31:426-428), procediendo de la siguiente manera: a 100 μ l de muestras se le añadieron 400 μ l de tampón acetato de sodio 50 mM pH 5.2 y 500 μ l de dextrana T-2000 (Pharmacia) al 2.5%. Se incubó 10 min a 40°C y se inactivó la enzima calentando 5 min a 100°C. Luego se añadió 1 ml de DNSA y se incubó 10 min a 100°C para desarrollar el color. Finalmente se

determinó la absorbancia a 546 nm contra un blanco en el que se sustituye la muestra por 100 µl de tampón acetato.

Paralelamente a esto se preparan controles para determinar la cantidad de azúcares reductores presentes inicialmente en las muestras, en este caso se adiciona la dextrana después de inactivada la enzima y se continua el procedimiento igual que para las determinaciones de actividad enzimática. Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de azúcar reductor, expresado en µmol, liberado en un minuto a pH 5 y se expresó en U/ml. Los valores de actividad se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Valores de actividad dextranasa medida en el sobrenadante de cultivo de la levadura *P. pastoris* crecida en medio mínimo YNB suplementado con glucosa (YNBGlu) o etanol (YNBEt) como única fuente de carbono. E: fase de crecimiento exponencial, S: fase de crecimiento estacionaria.

Medio de cultivo	Act. dextranasa (U/ml)*	
	E	S
YNBGlu	<1	40
YNBEt	56	54

* El valor representa la media de tres experimentos independientes. La desviación estándar fue menos del 10 % del valor de la media calculada.

Como se muestra en la tabla 2, la cepa transformada produjo altos niveles de la enzima dextranasa en los cultivos en que el etanol se empleó como fuente de carbono o en condiciones de agotamiento de la glucosa. Este resultado confirmó que la expresión del gen estructural codificante para la enzima dextranasa es regulada por el promotor *ICL*.

De esta forma se determinó que el fragmento 5' del gen *ICL* de la levadura *P. pastoris* fue capaz de dirigir la expresión del gen *dexA* de *P. minioluteum* por lo que este fragmento puede ser utilizado como un promotor alternativo en el sistema de expresión de *P. pastoris*. La expresión del gen *dexA* se reguló en dependencia de la fuente de carbono empleada por lo que la expresión de la proteína es controlada por las condiciones de crecimiento utilizadas.

Lic. Argia Poveda Marcheco
Representante Legal, CIGB



LISTA DE SECUENCIAS

<110> CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

<120> Fragmentos de ADN del gen ICL de la levadura metilitrófica *Pichia pastoris*.

<130> Listado de Secuencias (Español)

<140> 2000/122

<141> 2000-05-26

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 684

<212> ADN

<213> *Pichia pastoris*

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(684)

<223> Secuencia que contiene la región 5' reguladora del gen ICL.

<400> 1

```
gaattcggac aaatgtgctg ttccggtagc ttgtaggaag cggcatccgt agggcaatat 60
acgactatag cttctaaagc gtagtacaat gaaatgttcg aaggaacaan aaacggattt 120
gtttttcgta ggctcaaccn gttgaggtgt aactctttag ngaaagggtg agattgattg 180
ttcgaagtag gggcctcaaa gggaaagaga aaaaaaaaaa tacaccgaag agttacgtaa 240
gcatatattt ttacgtaaa gcatgattga atttcagcag tattgtttta caaggctgat 300
gtcgtgtgcc aatcaaaaaca aaagagattc gcataatgcc ataattgggg tgtgtgggng 360
nccccnaaaa cgtctttctc atcatcatct gcaaccccca tcgaacctca ttaaatacaca 420
tgacttggtg gatcctcggt caactcgttc cgtgcaccca ttccaccccg ggctgaccaa 480
cgcaagggtt tccgagagtc cgctacccca gatttatatc agcaaccagt cacctttttc 540
cgggcacgac tctatatgcc ctggaaaacc ggagacgatg agcctgacta taaaagggtga 600
cagaaccccc aactctggtt aatctcttca acaaatactt tattttcttt caattcaaag 660
aacacagtat caagtatatc aaga                                     684
```

<210> 2

<211> 360

<212> ADN

<213> *Pichia pastoris*

<220>

<221> terminator

<222> (1)..(360)

<223> Secuencia que contiene la región 3' no codificante del gen ICL.

<400> 2

```
gtaataggag ttccctaagta gttaagataa ttgacttgag gtatttatag atttgtgtgt 60
aggtaatatc tatggtcgtc cattcttacc ttggtggggt gacggggcgg tgaataaatc 120
agttgcgatg aaagacttta caaccttgct accagagggt gcggtctact gattactaca 180
aacgacttgg ataaaatttt caattcaaaa tcaatataaa aaaaaaaact taacatcact 240
gatgtttcac taaactcttt aaacgctcaa cctcagcttc caactcgctc ttgcaaatca 300
gtaactcctc aactttgtct tccagttgac tcattctctt catcttctta gccctggaac 360
```

<210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 oligonucleótido

 <400> 3
 tchggwtggc artgytchtc h 21

 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 oligonucleótido

 <400> 4 21
 gtncahgarg aycarttyaa r

 <210> 5
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 oligonucleótido

 <400> 5 27
 ctgcaggaat taattgcct tagacat

 <210> 6
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia
 Artificial:oligonucleótido

 <400> 6 26
 aagcttgctg taacgaatct agaact

 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
oligonucleótido

<400> 7
cctcgagctt gtaggaattc gca

23

<210> 8
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
oligonucleótido

<400> 8
aaggtgctag cattcttgat atac

24

<210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
oligonucleótido

<400> 9
atgctagcgc aagctttcct ttcc

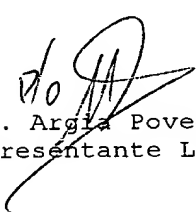
24

<210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
oligonucleótido

<400> 10
agctcgcat cagctaattct gcc

24

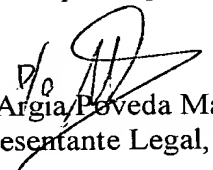

Lic. Argia Poveda Marcheco
Representante Legal, CIGB

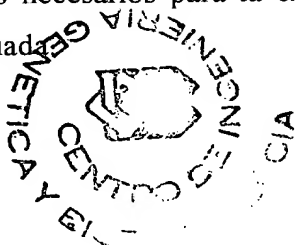


REIVINDICACIONES

FRAGMENTOS DE ADN DEL GEN ICL DE LA LEVADURA METILOTRÓFICA *Pichia pastoris*.

1. Fragmentos de ADN recombinantes caracterizados porque contienen las secuencias nucleotídicas identificadas como Seq.1 y Seq.2 en el listado de secuencias, pertenecientes al gen ICL, aislados de la levadura *Pichia pastoris*, los cuales son capaces de regular la expresión de genes heterólogos en levaduras, fusionados con uno de los fragmentos denominado Seq.1, o Seq.2, o con ambos fragmentos.
2. Fragmento de ADN recombinante identificado como Seq.1 según la reivindicación 1, caracterizado por tener la secuencia nucleotídica descrita en el listado de secuencias como Seq.1 comprendido entre los nucleótidos del 1 al 684, el cual comprende la región 5' reguladora del gen ICL aislado de la levadura *Pichia pastoris*.
3. Fragmento de ADN recombinante identificado por Seq.1 según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque es capaz de regular la expresión de genes heterólogos fusionados al mismo reprimiendo la expresión de estos en presencia de glucosa a concentraciones mayores del 2% o induciendo la expresión en ausencia de glucosa o en presencia de etanol a concentraciones mayores del 3%.
4. Fragmento de ADN recombinante identificado por Seq.2 según la reivindicación 1, caracterizado por tener la secuencia nucleotídica descrita en el listado de secuencias como Seq.2 comprendido entre los nucleótidos del 1 al 360, el cual comprende la región 3' reguladora del gen ICL aislado de la levadura *Pichia pastoris*.
5. Fragmento de ADN obtenido por vía recombinante o sintética caracterizado porque contengan la secuencia nucleotídica del fragmento denominado Seq.1 o Seq.2, o partes de estas, según las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, y que incluya uno o varios elementos reguladores necesarios para la expresión de genes heterólogos en una cepa hospedera apropiada.


Lic. Argia Poveda Marcheco
Representante Legal, CIGB



BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FRAGMENTOS DE ADN DEL GEN ICL DE LA LEVADURA METILOTROFICA

Pichia pastoris.

Figura 1. Análisis mediante "Northern blot" de los ARN extraídos de la levadura *P. pastoris* crecida en diferentes fuentes de carbono. (E): ARN extraído de cultivo en fase exponencial, (S): ARN extraído de cultivo en fase estacionaria. YPD, YPE e YP, medio rico en los que la glucosa, el etanol o los amino ácidos se emplean como fuentes de carbono, respectivamente. Como sonda se empleó el ADN correspondientes al gen *ICL* y al gen codificante para la β -actina (*ACT*) de *P. pastoris*.

Figura 2. Efecto de la glucosa sobre la expresión del gen *ICL*. Los ARN se hibridaron con la sonda de *ICL* y con la sonda de β -actina. La línea 1 corresponde a T=0 y las líneas 2-6 representan los tiempos a partir de la adición de glucosa: a los 10, 20, 30, 60 y 120 min, respectivamente. Como sonda se empleó el ADN correspondientes al gen *ICL* y al gen codificante para la β -actina (*ACT*) de *P. pastoris*.

Figura 3. Mapa de restricción del gen *ICL* de *Pichia pastoris*.

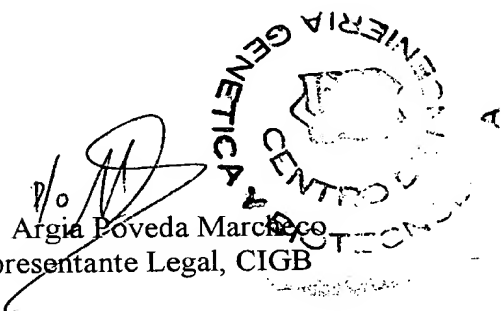
Figura 4. Esquema general de la construcción de los plásmidos pRS316-*ICL* y pRS426-*ICL*.

Figura 5. Esquema general de la construcción del plásmido pOVICL::HIS3.

Figura 6. Esquema general de la construcción del plásmido pIV-1.

Figura 7. Esquema general de la construcción del plásmido pIVDEX.

Figura 8. Esquema general de la construcción del plásmido TvpICL.


Lic. Argia Poveda Marcheco
Representante Legal, CIGB

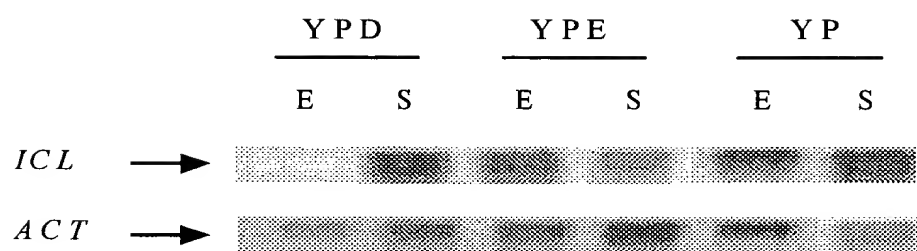
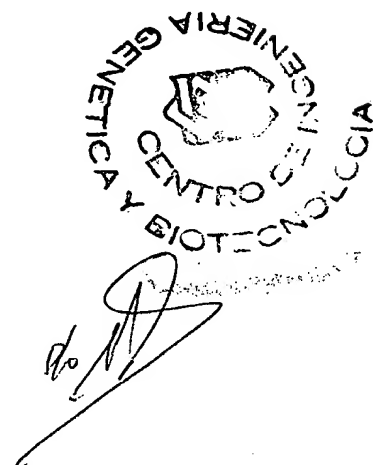


Figura 1



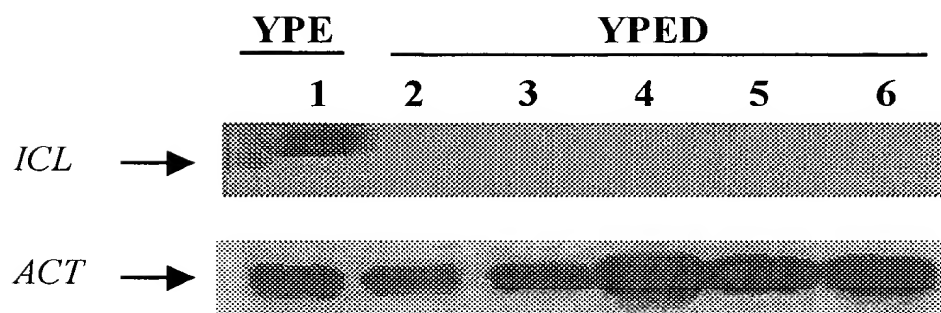
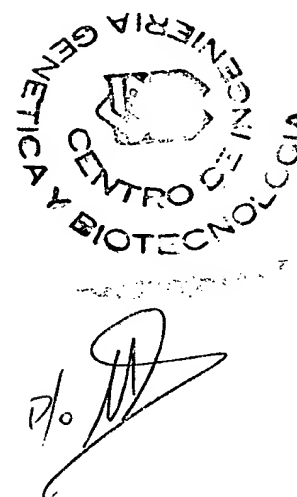


Figura 2



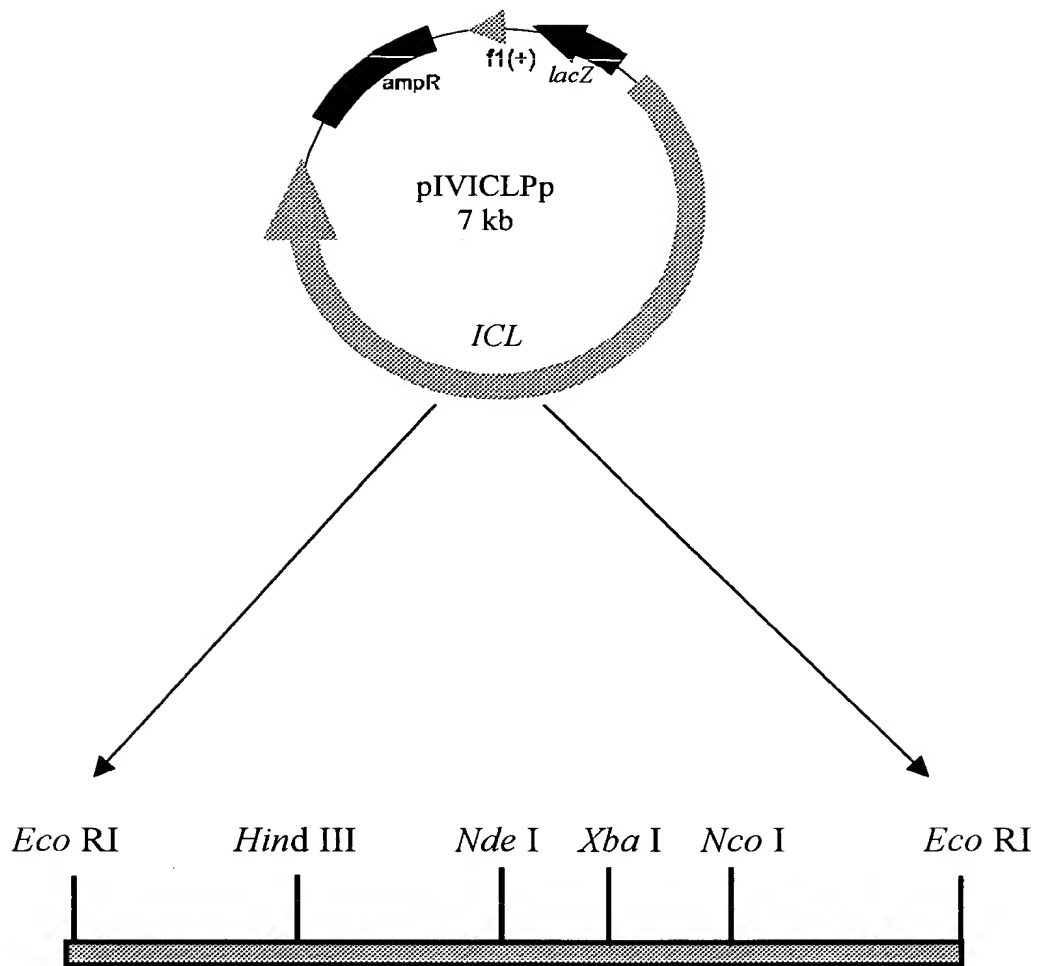


Figura 3



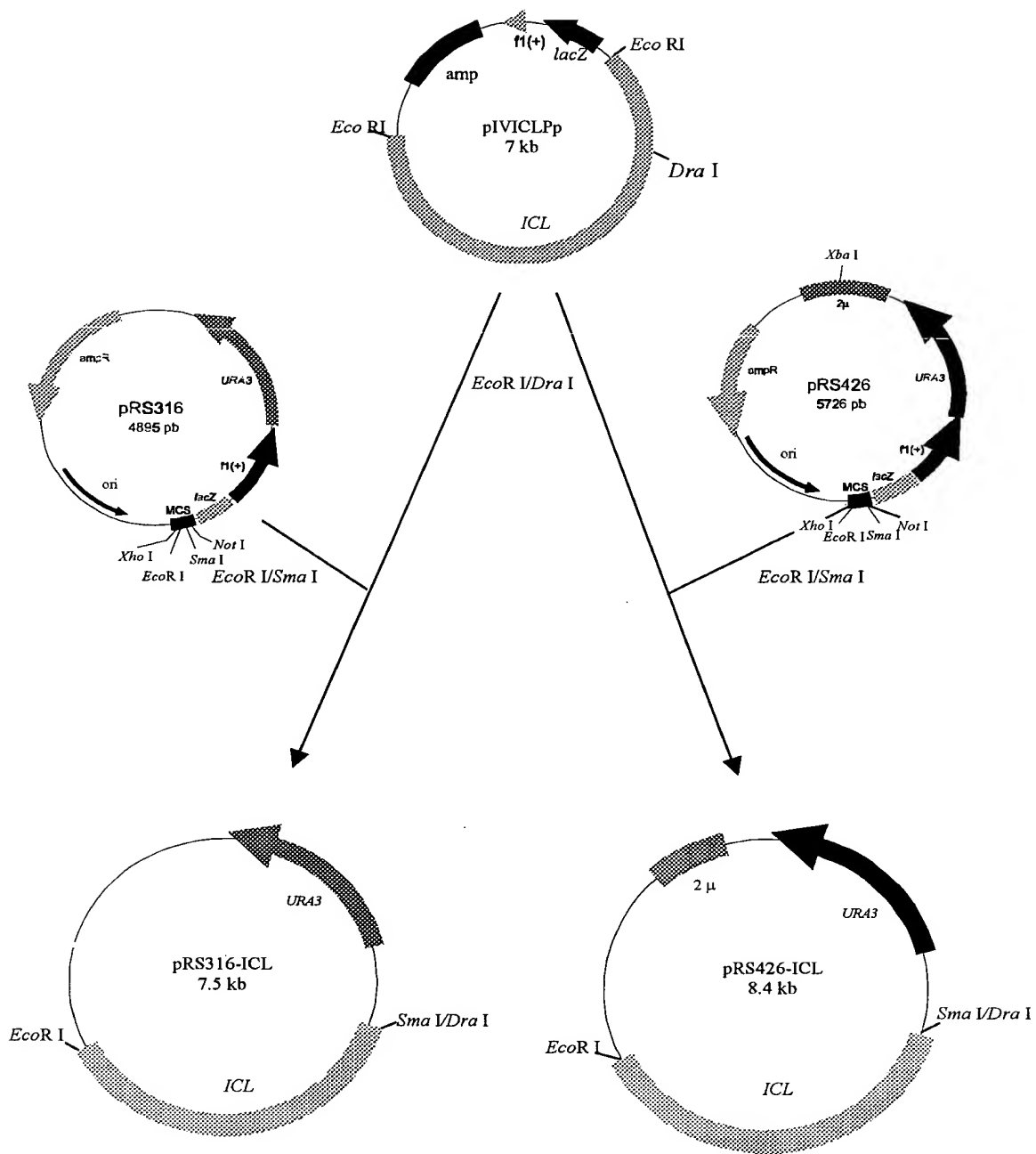
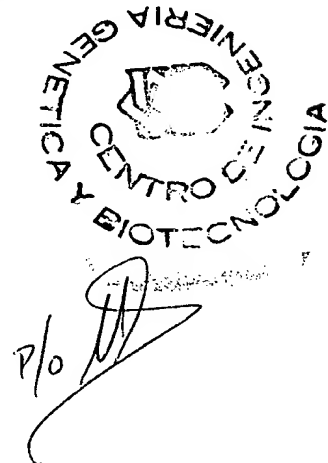


Figura 4



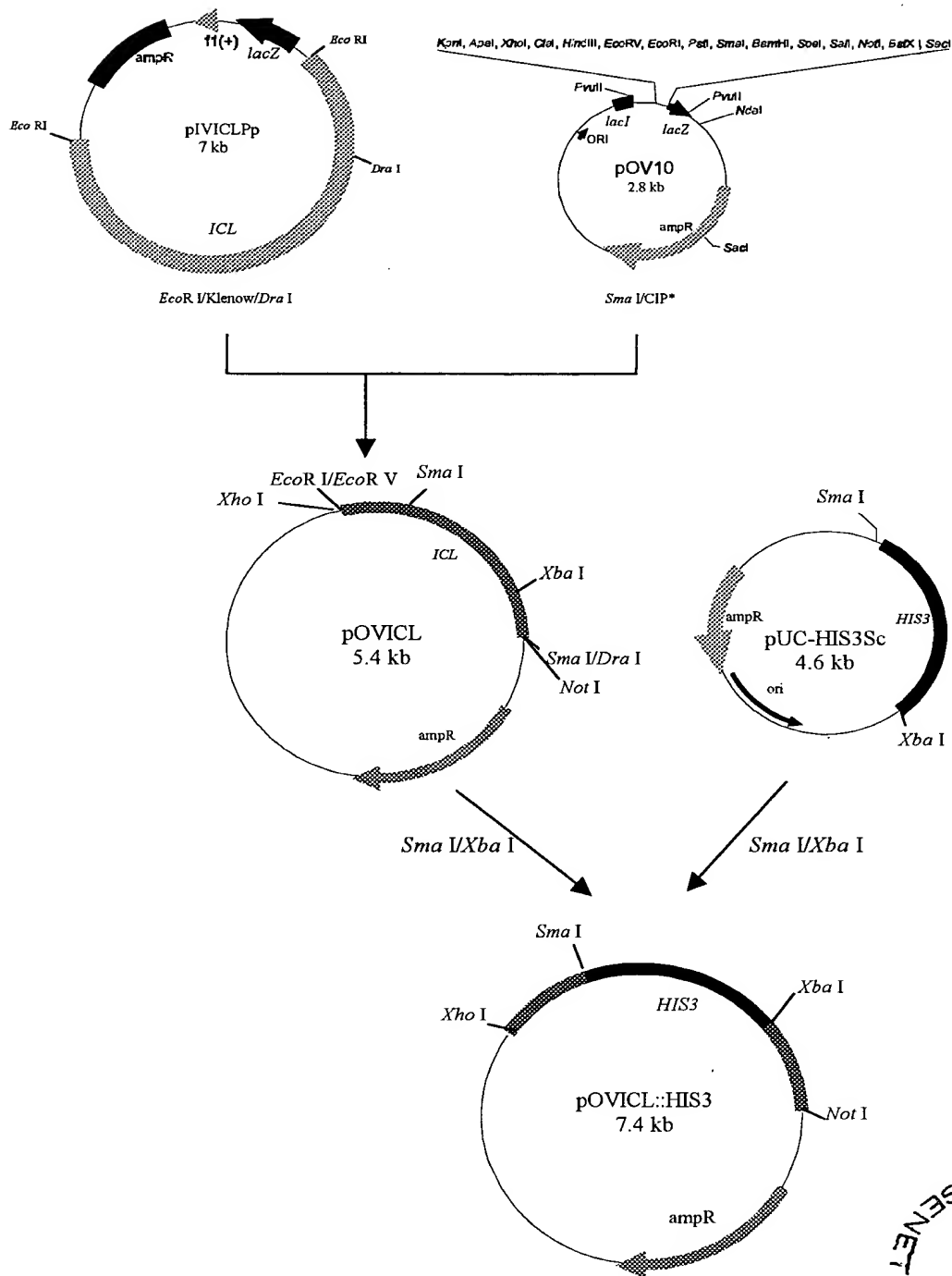


Figura 5



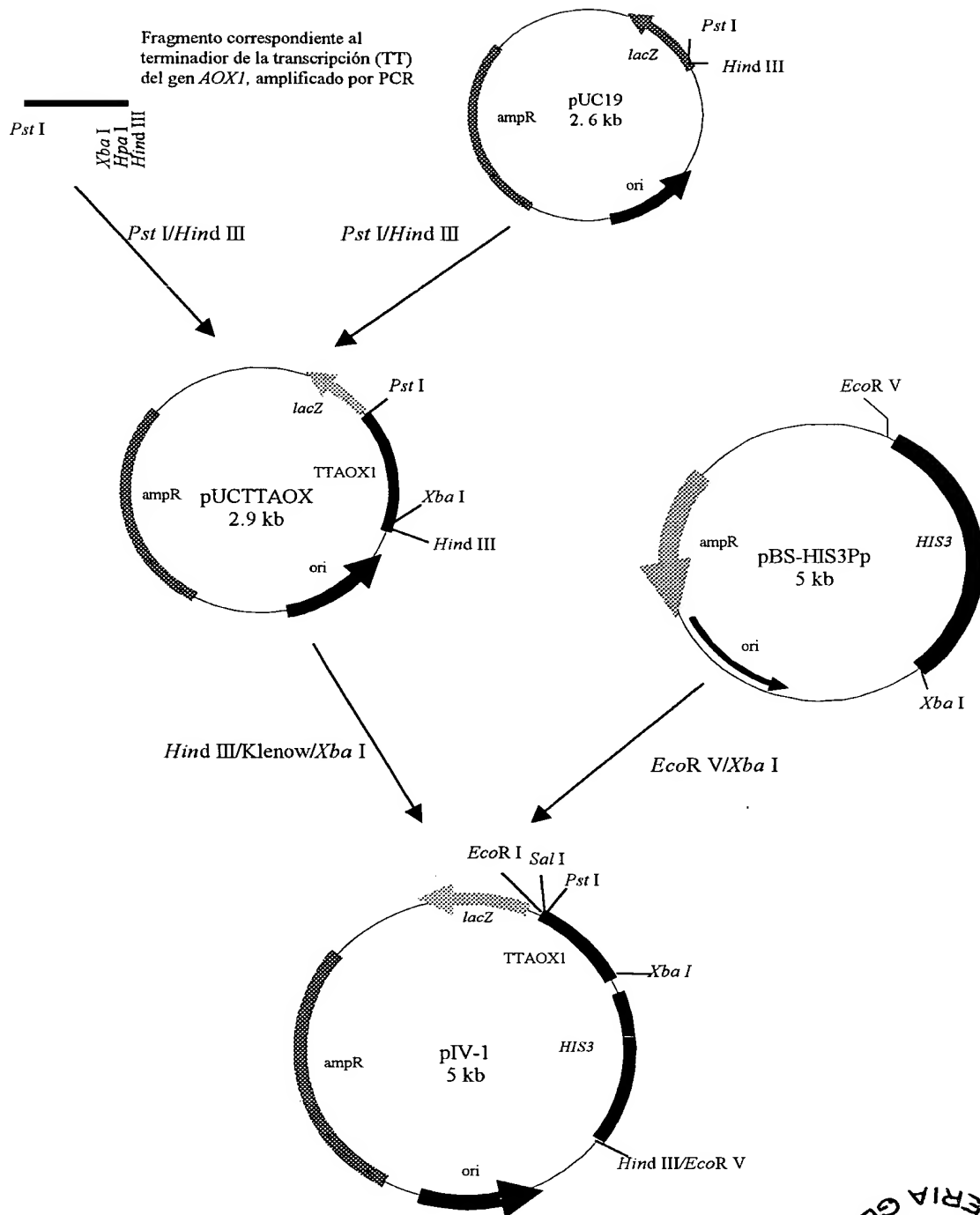
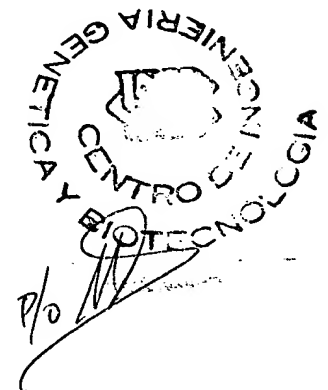


Figura 6



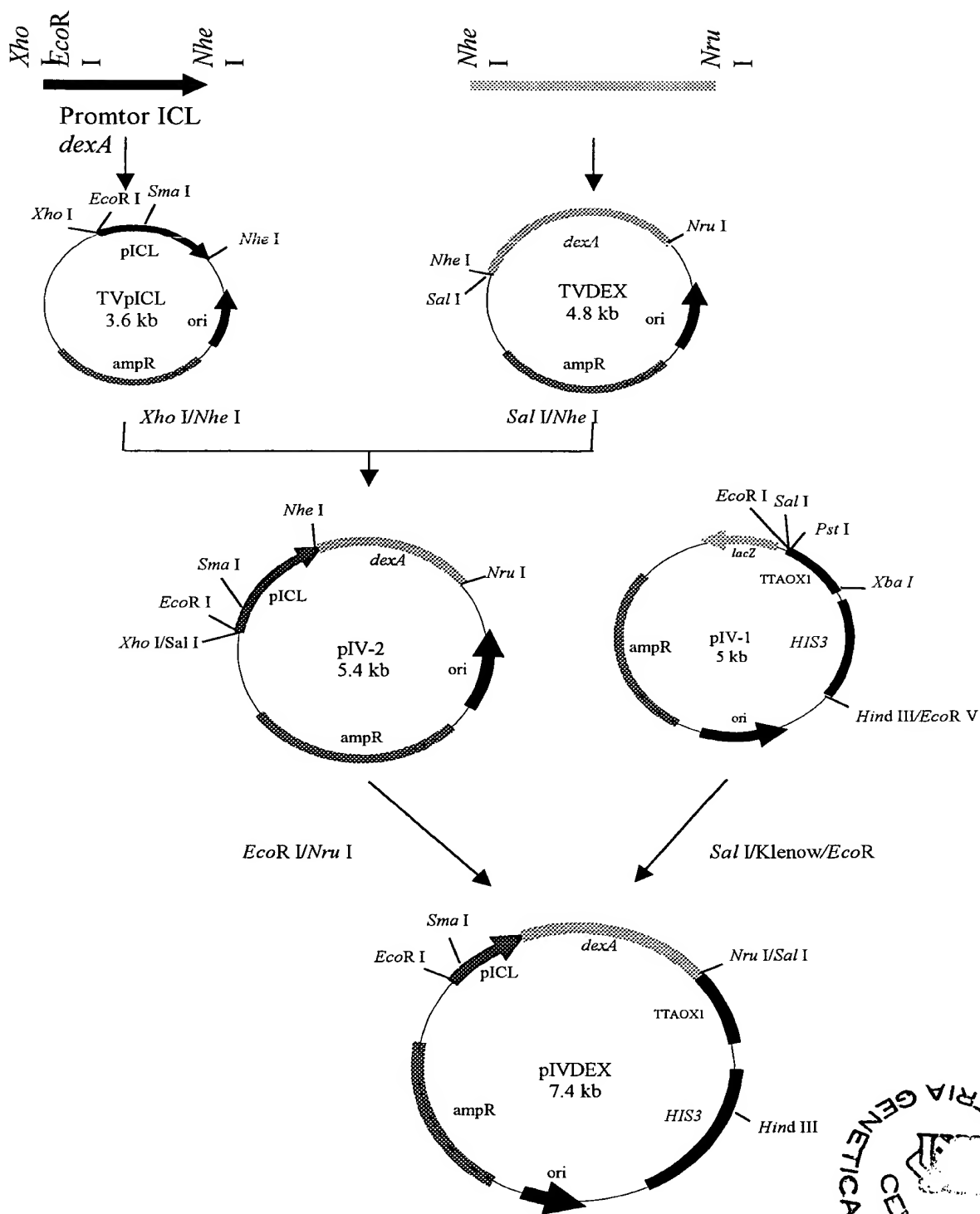
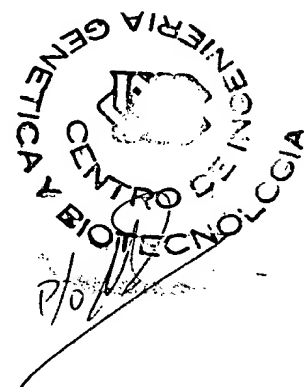


Figura 7



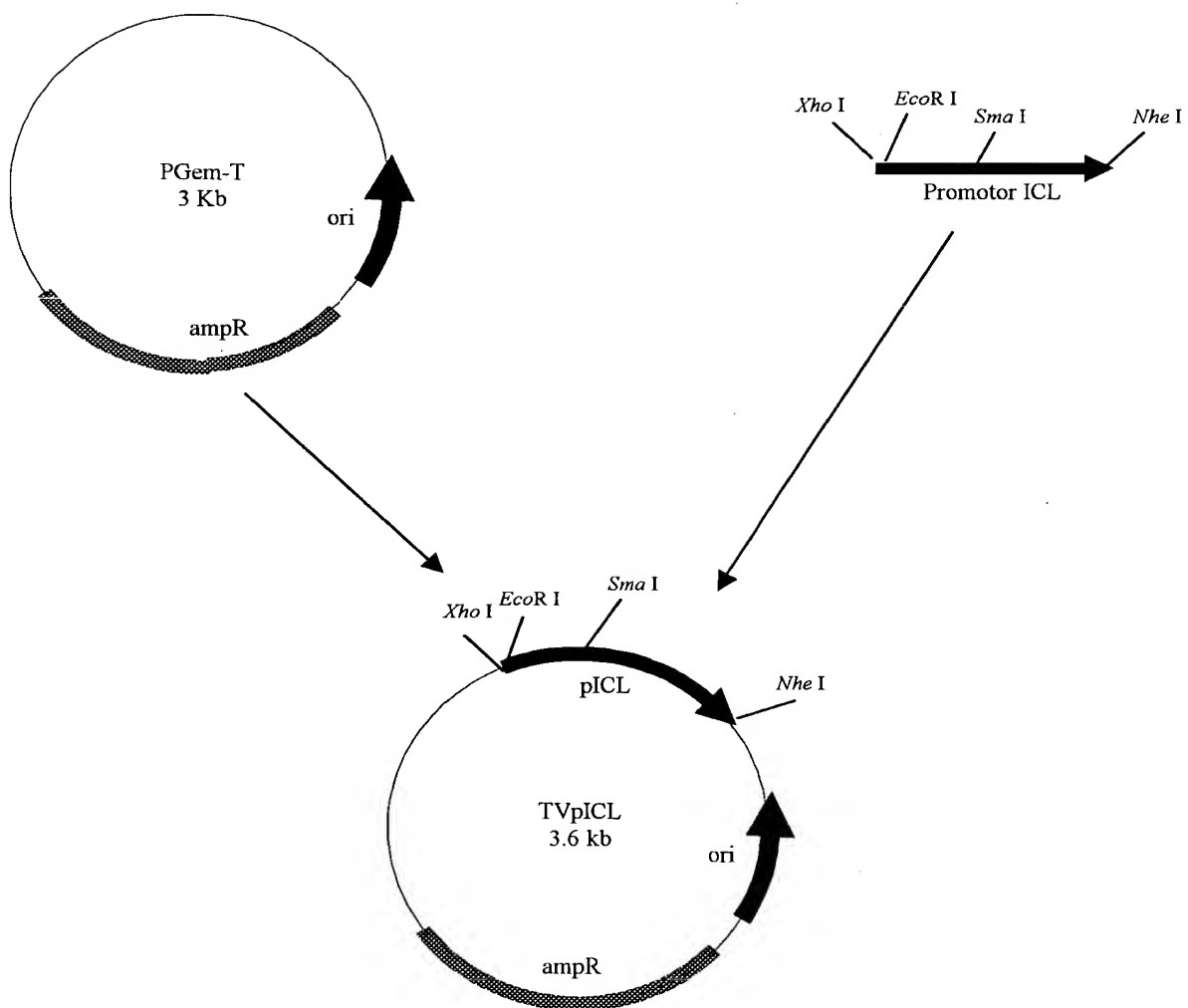


Figura 8



BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS. BCCM™
LMBP-COLLECTION

Demand BCCM™/LMBP/DBT4/00-13 for an authenticity check on a subculture

**Budapest Treaty of 28 April 1977 on the International Recognition of the Deposit of
Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure**

Demand for an authenticity check on a subculture of a deposited microorganism

Demand BCCM™/LMBP/DBT4/00-13

To : Name of the depositor : Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

Address : Ave. 31 entre 158 y 190.
P.O. Box 6162
Ciudad Habana 10600,
Cuba

**This International Depositary Authority having prepared subcultures for eventual distribution of
samples of the microorganism with the following identification reference,**

(Identification reference given to the microorganism by the depositor)

TPIC-1

(Accession number given by the International Depositary Authority)

LMBP 4107

**hereby sends one of these subcultures to the depositor in order to check the authenticity of the
preparation and asks him to return this form, completed and signed.**

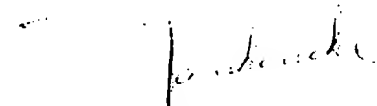
Remark: *If this form is not returned within 2 months, this International Depositary
Authority will assume the depositor found the subculture authentic.*

The International Depositary Authority:

**Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM™)
Laboratorium voor Moleculaire Biologie - Plasmidencollectie (LMBP)
Universiteit Gent, K.L. Ledeganckstraat 35
B-9000 Gent, Belgium**

**Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or
of authorized official(s):**

Date: May 23, 2000


Marline Vanhoucke
BCCM/LMBP curator

The depositor identified at the top of this form declares that the subculture is (tick):

☐ **Authentic** ☐ **Not authentic**

Signature of the depositor: (where the signature is required on behalf of a legal entity, the
typewritten name(s) of the natural person(s) signing on behalf of the legal entity should
accompany the signature(s)).

Date:

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS – BCCM™

LMBP-COLLECTION

Notification BCCM™/LMBP/DBT2/00-13 of completion of the procedure of an original deposit or of a new deposit

Budapest Treaty of 28 April 1977 on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure

Notification of completion of the procedure of an original deposit or of a new deposit with another International Depositary Authority

Notification BCCM™/LMBP/DBT2/00-13

To : Name of the depositor : Centro de Ingenieria Genética y Biotecnología

Address : Ave. 31 entre 158 y 190.
P.O. Box 6162
Ciudad Habana 10600,
Cuba

This International Depositary Authority declares that it accepts the microorganism with the following identification reference.

(Identification reference given to the microorganism by the depositor)

TPIC-1

(Accession number given by the International Depositary Authority)

LMBP 4107

and that it has sent to the depositor the international form BCCM™/LMBP/BP/4/00-13 (in the case of an original deposit) or the international form BCCM™/LMBP/BP/5/ (in the case of a new deposit) and the international form BCCM™/LMBP/BP/9/00-13, being the viability statement for that microorganism.

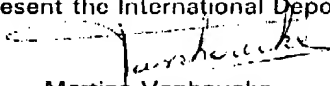
This International Depositary Authority reminds the depositor that he is bound by the terms and conditions stated in the Contract BCCM™/LMBP/DBT1/00-13 signed by both parties.

The International Depositary Authority :

**Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM™)
Laboratorium voor Moleculaire Biologie - Plasmidencollectie (LMBP)
Universiteit Gent
K.L. Ledeganckstraat 35
B-9000 Gent, Belgium**

Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):

Date : September 20, 2000


**Martine Vanhoucke
BCCM/LMBP curator**

**BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM™
LMBP-COLLECTION**

Page 1 of Form BCCM™/LMBP/BP/9/00-13 Viability statement

**Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for
the Purposes of Patent Procedure**

**Viability statement issued pursuant to Rule 10.2 by the International Depositary
Authority BCCM™/LMBP identified on the following page**

International Form BCCM™/LMBP/BP/9/00-13

To : Party to whom the viability statement is issued:

Name : Lic. Argia Poveda Marcheco

Address : Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
Ave. 31 entre 158 y 190.
P.O. Box 6162
Ciudad Habana 10600,
Cuba

I. Depositor:

I.1 Name : Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

I.2 Address : Ave. 31 entre 158 y 190.
P.O. Box 6162
Ciudad Habana 10600,
Cuba

II. Identification of the microorganism:

II.1 Accession number given by the International Depositary Authority:

LMBP 4107

**II.2 Date of the original deposit (or where a new deposit or a transfer has been
made, the most recent relevant date) : May 15, 2000**

III. Viability statement.

The viability of the microorganism identified under II above was tested on

: May 17, 2000

(Give date. In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent
viability test).

On that date, the said microorganism was: (mark the applicable box with a cross)

☒ **viable**

☐ **no longer viable**

**BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM™
LMBP-COLLECTION**

Page 2 of Form BCCM™/LMBP/BP/9/00-13 Viability statement

IV. Conditions under which the viability test has been performed:

(Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative).

V. International Depositary Authority

**Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM™)
Laboratorium voor Moleculaire Biologie - Plasmidencollectie (LMBP)
Universiteit Gent
K.L. Ledeganckstraat 35
B-9000 Gent, Belgium**

Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):

Date : May 23, 2000


**Martine Vanhoucke
BCCM/LMBP curator**

**BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM™
LMBP-COLLECTION**

Page 1 of Form BCCM™/LMBP/BP/4/00-13 Receipt in the case of an original deposit

**Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for
the Purposes of Patent Procedure**

**Receipt in the case of an original deposit issued pursuant to Rule 7.1 by the
International Depositary Authority BCCM™/LMBP identified at the bottom of next page**

International Form BCCM™/LMBP/BP/4/00-13

To : Name of the depositor : Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

**Address : Ave. 31 entre 158 y 190.
P.O. Box 6162
Ciudad Habana 10600,
Cuba**

I. Identification of the microorganism:

I.1 Identification reference given by the depositor:

TPIC-1

I.2 Accession number given by the International Depositary Authority:

LMBP 4107

**BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM™
LMBP-COLLECTION**

Page 2 of Form BCCM™/LMBP/BP/4/00-13 Receipt in the case of an original deposit

II. Scientific description and/or proposed taxonomic designation

The microorganism identified under I above was accompanied by:

(mark with a cross the applicable box(es))

a scientific description

yes ☒

no ☐

– a proposed taxonomic designation

yes ☐

no ☒

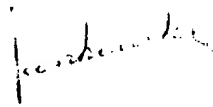
III. Receipt and acceptance

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on (date of original deposit) : May 15, 2000

IV. International Depositary Authority

Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM™)
Laboratorium voor Moleculaire Biologie - Plasmidencollectie (LMBP)
Universiteit Gent
K.L. Ledeganckstraat 35
B-9000 Gent, Belgium

Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):



Date : May 23, 2000

Martine Vanhoucke
BCCM/LMBP curator